

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publicati n :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 693 207

②1 N° d' nregistrement nati nal : 92 08254

⑤1 Int Cl⁵ : C 12 N 1/19, 15/53, C 12 P 7/62

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 03.07.92.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 07.01.94 Bulletin 94/01.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : ORSAN — FR.

⑦2 Inventeur(s) : Kazmaier Michael, Pompon Denis,
Mignotte Vieux Claudia, Teutsch Hermann, Werck-
Reichart Danielle et Renaud Michel.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Cabinet Regimbeau Martin Schrimpf
Warcoin Ahner.

⑤4 Souche de levure permettant la co-expression d'une activité mono-oxygénase de cytochrome P450 hétérologue et d'une NADPH-cytochrome P450-réductase endogène ou hétérologue et son utilisation à des fins de bioconversion.

⑤7 La présente invention concerne une souche de levure permettant la co-expression d'une activité mono-oxygénase de cytochrome P450 hétérologue et d'une NADPH-cytochrome P450-réductase endogène ou hétérologue, caractérisée en ce que l'un des gènes de la NADPH-cytochrome P450-réductase ou du cytochrome P450 est intégré dans le chromosome de ladite souche, et la souche est transformée par un vecteur portant une cassette d'expression de l'autre gène.

L'invention concerne également l'utilisation à des fins de bioconversion de ladite souche de levure ainsi qu'une séquence d'ADNc codant pour le cytochrome P450 CA4H de topinambour *Heliantus tuberosus*.

FR 2 693 207 - A1



La présente invention concerne une souche de levure permettant la co-expression d'une activité mono-oxygénase de cytochrome P450 microsomal hétérologue et d'une NADPH-cytochrome P450-réductase endogène ou hétérologue.

5 La présente invention concerne également un procédé de co-expression chez une levure d'une activité mono-oxygénase de cytochrome P450 microsomal hétérologue. et de la NADPH-cytochrome P450-réductase endogène ou hétérologue.

10 La présente invention concerne également l'utilisation à des fins de bioconversion d'une souche de levure selon l'invention.

Plus précisément, la présente invention concerne un procédé de bioconversion destiné à la monooxygénation spécifique, notamment à l'hydroxylation stéréospécifique, d'un composé substrat d'un cytochrome P450.

15 La présente invention concerne enfin une séquence d'ADNc codant pour le cytochrome P450 catalysant l'hydroxylase du trans-cinnamate dans les tubercules de topinambour ou CA4H.

20 Les cytochromes P450 sont des protéines à activité mono-oxygénase qui constituent une des plus grandes superfamilles de gènes connue chez les eucaryotes supérieurs. Ils sont capables d'oxyder une très grande variété de substrats généralement hydrophobes en se servant de l'oxygène moléculaire dissous dans le cytoplasme, ainsi que des équivalents réducteurs fournis par la NADPH-cytochrome P450-réductase. Ces réactions sont le plus souvent caractérisées par l'insertion d'un atome
25 d'oxygène dans des liaisons C-H, C=C, N=N, soit par l'oxydation d'un hétéroatome ou encore dans des cas plus rares par une réduction de groupes nitro ou une déshalogénation (Guengerich et Macdonald, 1990, FASEB J. 4, pp 2453-2459).

30 Les cytochromes P450 sont des protéines membranaires associés le plus souvent au reticulum endoplasmique, quelques formes étant mitochondriales.

35 Leur intervention chez l'homme et les animaux dans les premières étapes de la métabolisation de substances xénobiotique telles que les médicaments ou des polluants, ainsi que leur implication dans des voies importantes du métabolisme endogène des stéroïdes membranaires et

hormonaux, des acides biliaires, des phéromones, de la vitamine B, des acides gras, des prostaglandines ont fait des cytochromes P450 un objet d'un vif intérêt (Nebert et Gonzales, 1987, Ann. Rev. Biochem. 56, pp 945-993).

5 Les intenses efforts de recherche se sont traduits par le développement d'un grand nombre d'outils biochimiques, immunologiques et génétiques qui ont permis l'isolement d'environ 200 séquences d'ADN (génomique ou ADNc) à ce jour.

Par rapport au nombre rapidement croissant des séquences
10 connues de nombreuses isoformes de cytochromes P450 chez l'homme et chez les animaux, aucune séquence d'ADN d'un cytochrome P450 avec une fonction bien définie a été isolée. Bozak et al. (1990, PNAS, 90) ont bien reporté le clonage d'un ADNc végétal possédant toutes les caractéristiques conservées au sein des cytochromes P450 mais on n'a pas pu lui associer
15 une fonction. Dans le cadre de la présente invention, est revendiquée la séquence d'ADNc d'un cytochrome P450 végétal, la ca4H, qui catalyse l'hydroxylation en position 4 du trans-cinnamate. Le produit ainsi formé est le trans-coumarate.

D'une manière générale, les progrès de la recherche dans le
20 domaine des cytochromes P450 de plantes ont été retardés en raison de leur faible teneur dans les tissus végétaux et des grandes difficultés auxquelles on se heurte lors de leur purification. Néanmoins, on possède aujourd'hui de sérieuses évidences que les cytochromes P450 de plantes sont très similaires aux cytochromes P450 de mammifères concernant les
25 types de réaction, les mécanismes de réaction et le cycle catalytique (Reichert et al., 1980, Plant Physiol. 66, pp 600-604). Les oxydations de substrats endogènes dans les plantes, catalysées par des cytochromes P450, comprennent des hydroxylations de composés aliphatiques et aromatiques, des époxydations, des déméthylations et des réarrangements
30 intramoléculaires. Une quarantaine d'activités enzymatiques catalysées par des cytochromes P450 ont été caractérisées jusqu'à présent chez les végétaux. Elles sont impliquées dans les métabolismes des phénylpropanoïdes, des terpènes des lipides et participent aussi à la synthèse des phytoalexines, des anthocyanes, des tannins, des arômes, des
35 hormones, des stérols membranaires, des alcaloïdes et des cutines et

suberines. Compte tenu de leur participation à la synthèse de ce large nombre de métabolites végétaux dont certains présentent un grand intérêt industriel en tant qu'additifs alimentaires ou pigments naturels, le clonage et la surexpression coordonnée de cytochromes P450 dans un
5 microorganisme adapté afin d'y effectuer des réactions de bioconversion est clairement digne d'intérêt.

Il a été également reporté la déalkylation de substances xénobiotiques (Fonné et al., 1988, Plant Sci., 55, pp 9-20). On constate un net gain d'intérêt agronomique dans les cytochromes P450 de plantes
10 puisqu'ils interviennent dans les premières étapes de la métabolisation de certains pesticides ou herbicides tels que le diclofop ou le chlortoluron (Zimmerlin et Durst, 1990, Phytochemistry, 29, pp 1729-1732, Fonne-Pfister et Kreuz, 1990, Phytochemistry 29, pp 2793-2797) ce qui leur confère une résistance sélective à ces produits. Leur maîtrise et la compréhension de
15 leur fonction est donc de première importance pour l'industrie agronomique.

De part sa position clé dans le métabolisme secondaire de la plante, la cinnamate 4-hydroxylase à P450, qui est le point de départ commun à la synthèse d'un nombre très important de voies métaboliques, dont les
20 produits finaux ont des rôles cruciaux soit comme support structural de la cellule (lignines, phénols de la paroi), soit comme support à la protection superficielle (subérines), soit comme substance de défense de la cellule végétale contre des agents pathogènes (flavonoïdes, isoflavonoïdes, stilbènes, acides phénoliques, tannins), soit comme filtres de
25 rayonnement UV. Outre ces fonctions vitales, un certain nombre de composés issus de ces voies métaboliques sont très recherchés dans l'industrie alimentaire soit comme arôme ou colorant naturels. Pour exemple, on peut citer la vanilline, dont la première étape de la biosynthèse dans la gousse de *Vanilla planifolia* est la transformation du
30 trans-cinnamate en trans-coumarate. Le marché mondial de la vanilline est actuellement estimé à 5 000 tonnes/an.

La présente invention a pour objet une souche de levure permettant la co-expression d'une activité mono-oxygénase de cytochrome P450 hétérologue et d'une NADPH-cytochrome P450-réductase endogène ou hétérologue, caractérisée en ce que l'un des gènes de la
5 NADPH-cytochrome P450-réductase ou du cytochrome P450 est intégré dans le chromosome de ladite souche, et, la souche est transformée par un vecteur portant une cassette d'expression de l'autre gène.

Ledit vecteur peut être un vecteur d'intégration ou non.

Lorsque ledit vecteur est un vecteur d'intégration dans le
10 chromosome de la souche, les deux gènes se trouvent donc en fait intégrés dans le génome de la souche.

La présente invention a donc en particulier pour objet une souche de levure permettant la co-expression de l'activité mono-oxygénase de cytochrome P450 hétérologue et d'une NADPH-cytochrome P450-réductase endogène ou hétérologue, caractérisée en ce que le gène de la NADPH-
15 cytochrome P450-réductase est intégré dans le génome chromosomique de ladite souche et la souche est transformée par un vecteur portant une cassette d'expression du gène de cytochrome P450 hétérologue.

On utilisera, de préférence, un gène de cytochrome P450
20 microsomal.

On entend ici par "microsomal" les fractions de membranes intracellulaires, notamment du réticulum endoplasmique, rugueux ou lisse, de l'appareil Golgi.

Dans un mode de réalisation particulier, ledit vecteur n'est pas un
25 vecteur d'intégration mais un vecteur répliatif, notamment plasmidique.

Dans la présente demande de brevet, on entend par "gène hétérologue" un gène provenant d'un organisme autre qu'une levure.

Dans un mode de réalisation particulier le cytochrome P450 microsomal hétérologue est d'origine végétale.

30 On cite plus particulièrement comme cytochrome P450 microsomal selon l'invention la protéine catalysant l'hydroxylase du trans-cinnamate, encore appelée protéine CA4H, notamment provenant des tubercules de topinambour Helianthus tuberosus.

De façon appropriée, ledit gène dudit cytochrome P450 est la séquence d'ADNc codant pour ledit cytochrome P450.

Ledit gène dudit cytochrome P450 peut être un gène hybride.

On entend par "gène hybride" un gène pouvant résulter de recombinaisons homologues entre deux gènes de cytochrome P450 d'origines différentes, notamment d'organismes différents, ou pouvant résulter de fusions de parties de gènes de cytochrome P450 d'origines différentes, notamment d'organismes différents.

En particulier on cite la séquence d'ADNc codant pour la CA4H telle que représentée à la figure 1.

Dans un mode de réalisation particulier, la NADPH-cytochrome P450-réductase est la NADPH-cytochrome P450-réductase endogène de levure.

Dans un autre mode de réalisation ledit gène de la NADPH-cytochrome P450-réductase consiste dans la séquence d'ADNc codant pour la NADPH-cytochrome P450-réductase.hétérologue.

Le clonage de gènes de NADPH-cytochrome P450-réductase hétérologues, en particulier de plantes, a été décrit dans la demande de brevet français n° 92 04491.

On peut citer en particulier, de façon appropriée, comme gène de NADPH-cytochrome P450-réductase, les gènes d'origine végétale, notamment les gènes de NADPH-cytochrome P450-réductase d'Arabidopsis thaliana ou de topinambour Helianthus tuberosus.

Les séquences d'ADNc codant pour ces gènes d'origine végétale ont été représentées dans la demande de brevet français n° 92 04491.

Dans un mode de réalisation particulier, lorsque le gène de NADPH-cytochrome P450-réductase est hétérologue il est du même genre et de la même espèce que le cytochrome P450 hétérologue.

De manière à obtenir une intégration la plus stable possible, de préférence le gène de la NADPH-cytochrome P450-réductase est intégré dans le locus de la NADPH-cytochrome P450-réductase endogène.

Selon l'invention, la souche de levure peut être choisie notamment parmi les genres Saccharomyces, Hansenula, Kluyveromyces, Pichia et Yarrowia.

On cite plus particulièrement les levures du genre Saccharomyces cerevisiae.

Avantageusement, pour permettre une bonne modulation et une régulation de l'expression du cytochrome P-450 dans ledit vecteur, le gène de cytochrome P450 est mis sous le contrôle d'un promoteur inductible.

Dans un mode de réalisation particulier, on a utilisé le vecteur pYEDP60 décrit ci-après.

Avantageusement également, on a remplacé le promoteur naturel de la NADPH-cytochrome P450-réductase, laquelle a été mise sous le contrôle d'un promoteur hétérologue inductible.

Avantageusement encore, le gène de NADPH-cytochrome P450-réductase et le gène de cytochrome P450 sont placés sous le contrôle d'un même promoteur inductible, en particulier, le promoteur GAL10 CYC1 inductible en milieu galactose.

Dans un mode de réalisation particulier, ladite souche est obtenue à partir de la souche PES 1-3-U déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) sous le n° I-1187. Cette souche a été décrite dans la demande de brevet français n° 92 04491.

Cette souche exprime, lorsqu'elle est utilisée sur un milieu contenant du galactose, un niveau de NADPH-cytochrome P450-réductase qui est 20 à 30 fois supérieur au niveau présent dans la souche parentale comportant le promoteur naturel. A l'inverse, en l'absence de galactose, le niveau de réductase présent est extrêmement faible, en fait indétectable, c'est-à-dire au moins 100 fois inférieur au niveau présent dans la souche parentale.

Des niveaux d'expression intermédiaires entre ces deux extrêmes sont possibles en utilisant soit des durées d'induction par le galactose limitées (0 à 12 heures), soit des cultures en présence d'un mélange adapté de glucose et de galactose.

Dans l'exemple de réalisation détaillé qui va suivre ladite souche est la souche WRCA obtenue par transformation de la souche PES 1-3-U par le vecteur pCA4H/YeDP60.

De préférence, pour obtenir les taux d'expression maximum, la souche que co-exprime la DADPH-cytochrome P450-réductase est le cytochrome P450 dans un rapport molaire NADPH-cytochrome P450-réductase/cytochrome P450 optimum entre 1/3 et 1/10, notamment 1/5.

5 La variation des taux d'expression respectifs peut être obtenue en variant le nombre de copies des gènes respectifs et/ou en employant des promoteurs différents et plus ou moins forts et/ou en décalant le temps d'induction des promoteurs respectifs.

Dans le but d'obtenir des grandes quantités d'une molécule d'intérêt
10 industriel par un procédé de bioconversion, le choix du microorganisme le mieux adapté pour l'expression du complexe cytochrome P450/P450 réductase est primordial. A cet égard, selon la présente invention, la levure S. cereviae, recombinée dans l'optique de conférer au P450 hétérologue un environnement optimal pour l'expression efficace de son
15 activité est particulièrement appropriée pour les raisons suivantes : 1) la levure S. cer. est un microorganisme unicellulaire eucaryotique contenant l'infrastructure cellulaire (le reticulum endoplasmique) nécessaire pour l'expression de cytochromes P450 microsomaux, 2) S. cer. étant le microorganisme eucaryotique le mieux étudié à ce jour, un grand
20 nombre d'outils biochimiques et génétiques ont été mis au point, 3) S. cer. a été montré comme un bon système d'expression pour un grand nombre de cytochromes P450 de mammifères, 4) de part de son temps de génération court pour une cellule eucaryotique et par sa faculté de pouvoir pousser à des hautes densités cellulaires dans des milieux peu complexes, S. cer. est
25 un système modèle pour une approche industrielle de production de molécules d'intérêt par bioconversion.

Selon la présente invention, une attention particulière a été portée à la co-expression à un haut niveau de la CA4H et de la P450 réductase associée. La P450 réductase ayant un cycle catalytique plus rapide que les
30 cytochromes P450, il est particulièrement important de respecter un rapport molaire essentiel au bon fonctionnement dans la levure. En effet, un rapport molaire réductase/P450 hétérologue trop bas conduit à une faible activité spécifique du fait du défaut en réductase. Un rapport molaire réductase/P450 hétérologue trop élevé conduit à la destruction
35 d'une fraction importante du P450 du fait du fort accroissement de cycles abortifs. C'est pourquoi, afin de respecter au mieux un rapport molaire

optimal réductase/P450 on a utilisé, selon l'invention, une levure recombinante chez laquelle le promoteur naturel du gène endogène de la P450 réductase a été remplacé par le promoteur inductible GAL10/CYC1. Puisque la séquence de la C4AH sur plasmide est sous contrôle du même
5 promoteur on peut raisonnablement admettre que le rapport molaire final est donné par le nombre de copies du plasmide par rapport au gène copie simple de la réductase.

Selon la présente invention, on a construit une souche recombinante de levure qui assure un niveau optimal pour l'expression du
10 premier cytochrome P450 de plante à fonction connue. Plus précisément, pour un niveau d'expression comparable à celui trouvé dans la littérature de 100 picomoles par mg de protéines microsomales, l'activité spécifique est de l'ordre de 400 min⁻¹, la valeur la plus élevée jamais mesurée pour un cytochrome P450 microsomal. Cette activité reste de surcroît stable dans
15 le temps. En particulier, selon la présente invention on décrit donc une souche recombinante de levure qui sur les critères de productivité est tout à fait adaptée à la bioconversion du trans-cinnamate en tr-coumarate par la CA4H de topinambour.

La présente invention fournit donc également un procédé de co-
20 expression chez une levure de l'activité mono-oxygénase de cytochrome P450 microsomal hétérologue, caractérisé en ce qu'on cultive dans un milieu de culture approprié une souche selon l'invention.

La présente invention a également pour objet l'utilisation à des fins de bioconversion d'une souche de levure selon l'invention.

25 La présente invention a, en particulier, pour objet un procédé de bioconversion destiné à la monooxydation spécifique d'un composé substrat d'un cytochrome P450, caractérisé en ce qu'on convertit un milieu

contenant ledit composé ou un précurseur avec l'une des souches selon l'invention exprimant l'activité monooxygénase dudit cytochrome P450 et en ce qu'on récupère ledit composé substrat monooxygéné.

5 De préférence, on utilise comme milieu de conversion le milieu de culture de la souche. Néanmoins, il est possible de prévoir, lorsque la masse de levure initialement cultivée est suffisante, d'effectuer la conversion dans un milieu qui n'est pas un milieu de culture.

10 En général, le substrat est contenu dans le milieu, il rentre dans les cellules où il est converti, puis est relargué dans le milieu. Toutefois, dans certains cas, le milieu peut contenir uniquement un précurseur du substrat, le substrat n'apparaissant qu'à l'intérieur après transformation du précurseur.

15 La mono-oxydation peut être, par exemple, une hydroxylation stéréospécifique, notamment lorsque le cytochrome P450 est la CA4H, auquel cas le composé substrat est le trans-cinnamate et on récupère le trans-coumarate.

20 Enfin, la présente invention a aussi pour objet une séquence d'ADNc codant pour le cytochrome P450 CA4H de topinambour Helianthus tuberosus, notamment la séquence d'ADNc telle que représentée à la figure 1 ou une séquence d'ADNc s'hybridant dans des conditions faiblement stringentes à 50°C et/ou présentant au moins 60 % d'homologie avec l'une des séquences précédemment décrites.

25 D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lumière de la description détaillée du mode de réalisation qui va suivre, illustrée par les dessins annexés sur lesquels :

- la figure 1 représente l'ADNc du gène de cytochrome P450 de topinambour Helianthus tuberosus CA4H,
- la figure 2 représente le schéma de clonage de la CA4H de topinambour dans le vecteur de lecture pYED P60,
- 30 - la figure 3 représente, schématisée, la souche de levure WRCA surexprimant simultanément en milieu galactosé une CA4H exogène et la NADPH-cytochrome P450-réductase endogène (ci-après abrégé par "P450-réductase"),

- la figure 4 représente le spectre de différence d'absorption en présence de monoxyde de carbone d'une fraction microsomale de souche WRCA,

5 - la figure 5 représente le spectre de perturbation de type I suite à l'ajout de l'acide trans-cinnamique aux microsomes à partir de la culture induite de la souche WRCA,

- la figure 6 représente un chromatogramme de détection du trans-cinnamate après conversion du trans-cinnamate par une culture de WRCA en milieu galactosé,

10 - la figure 7 représente la variation de l'amplitude d'absorption dans un spectre de perturbation de type I en fonction du trans-cinnamate ajouté en quantités croissantes à des microsomes oxydés issus d'une culture induite de la souche WRCA,

15 - la figure 8 représente l'efficacité de couplage entre la NADPH P450-réductase de levure et la CA4H de topinambour dans les microsomes de la souche WRCA,

20 - la figure 9 montre une représentation selon Linweaver-Burte donnant l'inverse des activités CA4H mesurées en fonction de l'inverse de la concentration de trans-cinnamate ajouté permettant la détermination de la vitesse maximale de conversion de la CA4H dans les microsomes de levure ainsi que le K_m ,

- la figure 10 représente la cinétique de formation de p-coumarate sur des microsomes de WRCA,

25 - la figure 11 représente la cinétique de formation de p-coumarate à partir du trans-cinnamate sur cellules entières contenant la CA4H de topinambour.

PARTIE EXPERIMENTALE

1) Isolation de l'ADNc du Cytochrome P450 catalysant l'hydroxylation du tr-cinnamate dans les tubercules de topinambour (CA4H = cinnamate 4-hydroxylase.E.C.1.14.13.1).

5 La procédure de clonage de la CA4H met en oeuvre des méthodes classiques de la biologie moléculaire connues de l'homme de l'art. Le protocole de purification, ainsi que l'obtention d'un anticorps anti-CA4H spécifique à l'aide de la protéine purifiée, est décrit dans la littérature scientifique (Gabriac et al, Archives of
10 Biochemistry and Biophysics, 1991, Vol 288, pp 302-309) et n'est pas repris en détail ici. Brièvement, des tranches de tubercules de topinambour, incubés dans un milieu contenant du manganèse pour induire la synthèse de l'activité enzymatique de la CA4H, constitue le matériel de départ pour la préparation de la fraction microsomale. Il
15 suit une première étape d'enrichissement en CA4H par une partition de phases en triton X-114, et deux étapes de chromatographie sur DEAE-Trisacryl et sur Hydroxylapatite. La protéine ainsi purifiée, qui montre un poids moléculaire apparent de 57KD en gel SDS-Acrylamide, a été utilisé
20 pour la fabrication d'anti-corps polyclonaux. Ces anti-corps réagissent de manière sélective avec un polypeptide de 57 KD en Western blot et inhibent aussi fortement l'activité CA4H dans des microsomes de différentes es-
25 pèces végétales. Leur utilisation pour cribler une banque d'ADNc de topinambour dans le phage lambda gt11, obtenue à partir de tubercules induits pour la surexpression de la CA4H, a permis d'isoler un fragment d'ADNc de 1130 bp
30 présentant des séquences caractéristiques de cytochromes P450 bactériens, fongiques ou animaux. Ce fragment a été ensuite utilisé comme sonde pour cribler une deuxième banque d'ADNc de topinambour dans le phage lambda gt10 construite par amorçage à l'oligodT. Ceci a permis d'iso-
35 ler un clone de 1608 bp qui présente toutes les séquences

caractéristiques d'un P450 et la séquence complète est montré en figure 1. Cet ADNc peut être identifié comme étant celui de la CA4H de topinambour pour des raisons suivantes : a) les pH isoélectriques de la protéine purifiée et celui calculé du polypeptide issu de l'ADNc, sont tous deux voisins de pH 9,0 b) l'anticorps anti-CA4H reconnaît dans la banque d'expression un polypeptide de fusion présentant des séquences caractéristiques de P450 c) la partie 5' terminale du polypeptide déduit de l'ADNc isolé par criblage immunologique avec un anticorps spécifique anti-CA4H est totalement identique à la séquence N-terminale de la CA4H purifiée.

Nous disposons donc de la première séquence nucléotidique codant pour un cytochrome P450 d'origine végétale de fonction connue, déterminée à ce jour.

2) Clonage de la région codante de la CA4H de Topinambour dans le vecteur d'expression de levure pYEDP 60

La méthode de clonage schématisée en figure 2 fait appel à une étape d'amplification par PCR, qui par un choix judicieux des oligonucléotides servant d'amorces pour la PCR, résulte en l'amplification sélective de la région codante de la CA4H, débarrasse l'ADNc amplifié des bordures 5' et 3' non-codantes et introduit également des sites de restriction convenables pour la suite du sous-clonage. Après un passage du fragment d'ADNc amplifié possédant des bouts francs dans pUC 19 digéré par SmaI, le plasmide pCA4H ainsi obtenu est ensuite digéré par des enzymes de restriction adéquats flanquant le fragment d'ADNc, qui ont été préalablement introduits par PCR. Le vecteur de levure pYEDP60 est ensuite digéré au niveau du site de multiclونage situé entre le promoteur GAL10/CYC1 et le terminateur PGK de façon à générer un vecteur linéaire comprenant des bouts compatibles avec le fragment d'ADNc contenant la région codante de la CA4H. Puis on procède à la recircularisation dans un milieu réaction-

nel comprenant le vecteur linéarisé, le fragment d'ADNc contenant la CA4H et de la ligase. Le vecteur recircularisé ainsi obtenu contient les séquences nécessaires à la propagation chez *E. coli* (origine de replication et le gène bla conférant la résistance à l'ampicilline chez *E. coli*), à la propagation chez *S. cer* (origine de replication chez *S. cer* et les gènes URA3 et ADE2 permettant de compléter les auxotrophies de la souche hôte), ainsi que les signaux de régulation permettant l'induction de l'expression de l'ADNc codant pour la CA4H en milieu galactosé (figure 2). Toutes les méthodes utilisées afin de réaliser ce clonage sont des méthodes standard et bien décrites dans des livres de référence (Sambrook, Fritsch and Maniatis, 1989, Molecular Cloning, 2 éd., CSH Laboratory Press). La construction du vecteur de levure pYEDP 60 a été décrit dans la littérature (Urban, Cullin et Pompon, 1990, Biochimie, 72, pp 463-472).

3) Caractérisation de l'activité enzymatique de la CA4H chez *S. cer*.

3.1) Description de l'environnement génétique de la souche WRCA

En figure 3 est schématisé la souche de levure WRCA qui a été construite de façon à surexprimer simultanément en milieu galactosé la CA4H exogène et la P450 Réductase endogène. La souche WRCA est obtenue par transformation de la souche PES 1-3U par le plasmide pCA4H/YeDP60 décrit ci-dessus. La souche PES 1-3U, qui porte comme mutations connues Ura3, Ade2, His1, et Leu2, a été transformée selon une méthode standard au chlorure de lithium (Pompon, 1988, Eur. J. Biochem., 177, pp 285-293), suivie d'une sélection pour la restauration du phénotype Ade+ qui est apporté en présence du plasmide. La souche PES 1-3U, dont la description détaillée fait objet d'une demande de brevet en France n° 91 08884, a été déposée auprès de la Collection Nationale des Cultures et de

Microorganismes le 17 mars 1992, sous le numéro de dépôt I-1187. Cette souche haploïde (mating type alpha) est complètement isogénique à la souche de laboratoire W303.1B, sauf la région promotrice précédant la phase
5 codante de la P450 Réductase endogène, qui est modifiée par recombinaison homologue de façon à remplacer le promoteur naturel de la P450 Réductase par le promoteur inducible GAL10-CYC1.

3.2 Détermination de la concentration en Cytochrome

P450 dans la fraction microsomale de la souche WRCA

On réalise une préculture (150 ml) de la souche WRCA en milieu SW5 à 28°C sous agitation modérée (100 rpm) jusqu'à une densité cellulaire de 3 OD, puis on ajoute
1 vol/vol de milieu YPGAL (induction de la CA4H et de la
15 P450 Réductase) et on continue la culture jusqu'à une densité cellulaire de 10 OD. On arrête la culture par centrifugation des cellules puis on procède à la préparation des microsomes selon un procédé standard impliquant la casse mécanique des cellules (Cullin et Pompon, 1988,
20 Gene, 65, pp 203-217). On obtient ainsi une solution homogène de microsomes de 2,8 ml, conservée à -80°C sous forme d'aliquots de 100 microlitres, et qui sert de solution stock pour toutes les expériences décrites par la suite. Pour mesurer la concentration totale en protéines
25 dans cette solution stock de microsomes on se sert de la méthode de Pierce avec la serumalbumine comme standard. La concentration globale en Cytochrome P450 contenu dans ces microsomes est mesurée par spectrophotométrie différentielle selon la méthode décrite par Omura et Sato
30 (1964, J. Biol. Chem. 239, pp 2379-2387) qui met en évidence la formation du pic caractéristique d'absorption autour de 450 nm du Cytochrome P450 réduit après fixation d'une molécule de monoxyde de carbone sur l'atome fer du chromophore, par rapport à la forme réduite du cytochrome
35 P450 en absence de monoxyde de carbone. Plus précisément,

on répartit dans deux cuvettes spectrophotométriques des quantités égales de la solution stock de microsomes (environ 2 mg de protéines totales) diluée 10 fois dans un tampon composé de 50 mM Tris-HCl pH 7,4 et 1 mM EDTA et à laquelle on a ajouté auparavant quelques grains de dithionite de sodium afin de réduire totalement les cytochromes P450 présents dans les microsomes et de consommer tout oxygène libre dissous dans la solution. Les deux cuvettes contenant des quantités égales de microsomes réduits servent à faire la ligne de base entre 400 et 500 nm. On fait ensuite barboter une dizaine de bulles de monoxyde de carbone dans la cuvette d'essai, ce qui mène à la formation du pic d'absorption vers 450 nm dû à la fixation du monoxyde de carbone à l'ion fer du groupe hème présent dans le cytochrome P450, par rapport aux microsomes réduits dans la cuve témoin. En se servant du coefficient d'absorption qui est de $91 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour les cytochromes P450 on peut déduire directement de l'amplitude du pic la concentration totale en cytochromes P450 contenu dans les microsomes. Dans la figure 4 est montré le spectre de différence en présence de monoxyde de carbone obtenu avec une solution de microsomes 10 fois diluée de la solution stock. A partir du spectre qui montre le pic caractéristique à 453,5 nm, nous avons déterminé la concentration globale dans les microsomes après induction est de 1,2 micromolaire. La culture de contrôle (PES 1-3U) ne montrant dans les mêmes conditions expérimentales et les mêmes conditions de sensibilité aucune trace détectable de cytochromes P450 nous pouvons conclure que le pic observé avec les microsomes de la culture induite de la souche WRCA doit provenir de l'expression de l'ADNc de la CA4H sur le plasmide.

3.3 Obtention d'un spectre de perturbation de type I suite à l'ajout de l'acide tr-cinnamique aux microsomes obtenus à partir de la culture induite de la

souche WRCA

Une des propriétés les plus intéressantes des cytochromes P450 est la possibilité de pouvoir monitorer l'interaction de différentes molécules avec le site actif.

5 En effet, la force du champ des ligands détermine des spectres typiques et bien codifiés (type I, II ou I inversé). Les spectres de type I, caractérisant généralement l'interaction d'un P450 avec son substrat spécifique, sont définis par la formation d'un pic négatif vers

10 420 nm et d'un pic positif vers 390 nm suite à la fixation du substrat au cytochrome P450. Afin de fournir une preuve supplémentaire que le pic à 453,5 nm observé en figure 4 est bien dû à la présence de la CA4H de topinambour dans les microsomes de levure et que la protéines y

15 est sous une forme active capable de fixer son substrat propre, il a été tenté d'obtenir un tel spectre par l'adjonction du tr-cinnamate aux microsomes. Plus précisément, on répartit des quantités égales de la solution stock de microsomes (culture induite de la souche WRCA) diluée

20 10 fois dans un tampon contenant 50 mM Tris-Hcl pH 7,4 et 1 mM EDTA dans deux cuvettes spectrophotométriques. En présence d'oxygène dissous dans le milieu, on peut raisonnablement supposer que les cytochromes P450 dans les microsomes sont sous leur forme oxydée, ayant fixé de

25 l'oxygène sur le groupe hème. Une ligne de base est faite entre 370 et 490 nm avec les deux cuvettes identiques. Puis on ajoute à la cuve d'essai du tr-cinnamate à une concentration de 100 micromolaire, et on réalise un spectre différentiel absorption (cytochrome P450 oxydé

30 versus cytochrome P450 oxydé plus substrat spécifique) entre 370 et 490 nm. Dans la figure 5 est montré l'obtention d'un spectre de perturbation de type I caractéristique d'un P450 après fixation de son substrat, en utilisant la même solution stock de microsomes que sous

35 3.2 qui montre bien la formation d'un pic négatif impor-

tant à 418 nm et d'un pic positif à 390 nm après l'ajout du tr-cinnamate. Ce même type de spectre différentiel a été observé après l'ajout du tr-cinnamate à des microsomes de topinambour (Benveniste et Durst, 1974, C.R.

5 Acad. Sc. Paris 278D, pp 1487-1490). Ainsi le polypeptide issu de l'ADNc de la CA4H de topinambour possède toutes les caractéristiques spectrales d'un cytochrome P450 dans les microsomes de levure et est capable de fixer spécifiquement le tr-cinnamate comme substrat.

10 3.4 Démonstration de la conversion du tr-cinnamate en tr-coumarate par une culture de WRCA en milieu galactosé

Il est indispensable de prouver que le spectre de perturbation observée suite à l'ajout du tr-cinnamate aux microsomes contenant la CA4H de topinambour est corré-
15 à une activité catalytique de la CA4H qui résulte en la formation de tr-coumarate. Il est également très important de prouver que le tr-cinnamate ne rencontre pas de barrière de diffusion lors d'une culture de cellules en-
20 tières et que le coumarate formé sera accumulé dans le milieu de culture, en vue d'une application de bioconversion sur cellules entières à l'échelle industrielle. A cette fin l'expérience suivante a été réalisée : 0,5 ml d'une préculture de WRCA en milieu minimum ont été ajoutés
25 à 2 ml de milieu YPGAL frais contenant 10 microm de tr-cinnamate, puis on incube à 27°C sous agitation modérée. Après 6 heures les cellules sont centrifugées et on prélève 1 ml du surnageant auquel on ajoute 1 ml d'une solution saturée en NaCl et 1 ml d'acétate d'éthyle. Après
30 avoir mélangé rigoureusement les deux phases sur vortex, on sépare les phases organique et aqueuse par centrifugation, et on prélève un aliquot de la phase organique (acétate d'éthyle). On évapore à l'air et on reprend dans une solution 10 % méthanol. 20 microlitres de l'échantillon sont séparés
35 par HPLC sur colonne C18 en se servant d'un gradient linéaire.

COMPOSITION DU GRADIENT HPLCTABLEAU 1

5				
10	TEMPS (min)	DEBIT (ml/min)	COMPOSITION A(%) B(%)	
	0.00	1.00	100	0
15	1.00	1.00	90	10
	15.00	1.00	70	30
20	15.10	1.00	40	60
	17.00	1.00	100	0
25				

A = 0.01% TFA

B = Acetonitrile

30

Un étalonnage préalable avec du tr-cinnamate et du tr-coumarate commercial pur avait démontré que sous les conditions de chromatographie décrites les deux produits sont bien séparés. En effet le coumarate sort après 8 minutes environ, tandis que le tr-cinnamate sort après 11,5 min. En figure 6 est montré le chromatogramme de l'échantillon issu de l'expérience décrite ci-dessus. La longueur d'onde de détection choisie de 292 nm est un compromis où les deux substances absorbent bien. Il est clairement visible qu'il ne reste plus que des quantités négligeables et à peine détectables, alors qu'il apparaît un seul pic majeur à la position du tr-coumarate. Ainsi il est démontré que le polypeptide issu de l'ADNc végétal cloné est bien une enzyme à cytochrome P450 sur la base de ses propriétés spectrales et que son activité catalytique est l'hydroxylation du tr-cinnamate en position quatre pour former le tr-coumarate, sans apparition de produits secondaires. Le tr-cinnamate est apparemment accessible aux cytochromes P450 intracellulaires, tandis que le produit de transformation est retrouvé dans le surnageant. Ni substrat, ni le produit de la conversion sont apparemment toxique pour la levure.

3.5 Détermination de la constante d'affinité de la CA4H pour le tr-cinnamate dans les microsomes de levure

L'amplitude totale observée entre le maximum positif à 370 nm et le pic négatif à 418 nm dans un spectre de perturbation de type I, varie en fonction du substrat spécifique ajouté, lorsque le substrat est en concentration limitante par rapport aux cytochromes P450 capables de fixer ce substrat présents dans les microsomes. Si l'on reporte les valeurs inverses des amplitudes d'absorption mesurées dans un spectre de perturbation de type I en fonction de la valeur inverse des concentrations croissantes de substrat ajouté (représentation de Lineweaver-Burk), on obtient une droite et la constante d'affinité

du cytochrome P450 considéré pour son substrat spécifique peut être calculé directement à partir du point d'intersection de la droite avec l'axe X. En figure 7 est montrée une représentation de Lineweaver-Burk en reportant la variation de l'amplitude d'absorption dans un spectre de type I en fonction du tr-cinnamate ajouté en quantités croissantes à des microsomes oxydés issus d'une culture induite de la souche WRCA. Les conditions expérimentales étant identiques à celles décrites sous 3.3 à l'exception des concentrations en tr-cinnamate utilisées allant de 0,2, 1,0, 3,0, 10,0 à 30,0 microM, elles ne seront pas reprises ici. La constante d'affinité de la CA4H de topinambour dans les microsomes de levure en présence de la P450 Réductase endogène de levure ainsi mesurée est de 2,2 microM, ce qui est en excellente concordance avec les valeurs obtenues avec des microsomes de topinambour qui varient entre 1 et 10 microM selon les préparations (F. Durst, communication personnelle). Il est donc évident que la levure S. cer. fournit l'environnement similaire à celui de la plante pour l'expression efficace de la CA4H.

3.6 Détermination de l'efficacité de couplage entre la P450 Réductase de levure et la CA4H de topinambour dans les microsomes de la souche WRCA

Les cytochromes P450 ne sont pas autosuffisants pour effectuer l'hydroxylation de leurs substrats. Le complexe enzymatique actif est constitué de deux composants, le cytochrome P450 et la P450 Réductase, qui assure la chaîne de transport des électrons nécessaires à l'hydroxylation du NADPH vers le Cytochrome P450. En cas de couplage parfait (illustré en figure 8) on observera donc la consommation d'une molécule de NADPH par molécule de produit formé. Aucun cytochrome P450 végétal n'ayant jamais été exprimé chez la levure, il est primordial de s'assurer que la levure fournit l'environnement réducteur adéquat à l'activité enzymatique de la CA4H de topinambour.

Dans ce but l'expérience suivante a été réalisée : un mélange réactionnel constitué de 6 nM de CA4H (dilution 1 pour 200 de la solution stock de microsomes) dans un tampon phosphate 50 mM pH 7,4 et de NADPH réduit 0,1 mg/ml est réparti à parts égales dans deux cuvettes spectrophotométriques. La quantité de NADPH réduit dans les deux cuves étant identique, l'absorption différentielle initiale mesurée à 350 nm est zéro. Puis on ajoute à la cuvette d'essai du tr-cinnamate à la concentration finale de 10 microm. En cas de couplage parfait on doit enregistrer à 350 nm une diminution d'absorption correspondant à la consommation d'une quantité équivalente de NADPH. En figure 8 est montré l'enregistrement de cette expérience. L'ajout de 10 nmoles de tr-cinnamate résulte en une diminution de l'absorption initiale dans la cuve d'essai de 0,06 OD.

En se servant du coefficient molaire du NADPH réduit ($6200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) il est facile de convertir la variation d'absorption en moles NADPH oxydés. En effet, après l'ajout de 10 nmoles de tr-cinnamate 9,7 nmoles de NADPH ont été oxydés, ce qui résulte en un facteur de couplage de 1,03. Il est donc évident que la P450 Réductase de la levure est capable de parfaitement assurer la chaîne de transport des électrons vers la CA4H de topinambour afin de le faire fonctionner.

3.7 Détermination de la vitesse maximale de conversion de la CA4H dans les microsomes de levure ainsi que le Km

La vitesse maximale de conversion du cytochrome P450 végétal mesurée dans les microsomes de levure est une valeur très importante pour apprécier si S. Cer est un outil industriel intéressant pour y réaliser des bioconversions à l'aide de cytochromes P450, la vitesse de la réaction enzymatique étant un des critères principaux. Ceci d'autant plus que les cytochromes P450 de mammifères

sont connus pour être des enzymes dites "lentes". Dans la même expérience on déterminera également la constante de Michaelis, qui donne la concentration en substrat nécessaire pour que la CA4H fonctionne à 50 % de sa vitesse maximale. Sous 3.6 il a été démontré que l'efficacité de couplage entre la P450 Réductase de levure et la CA4H exprimé par la relation de NADPH consommé pour substrat converti est très voisin de 1. De ce fait il est possible de suivre l'activité de la CA4H en fonction de la concentration du tr-cinnamate ajouté par la vitesse de consommation du NADPH. En effet, le NADPH réduit absorbe fortement à une longueur d'onde de 340 nm (coefficient d'absorption molaire = 6200) et la pente de la variation de l'absorption dans le temps est directement proportionnelle à la vitesse de la transformation du tr-cinnamate en coumarate par la CA4H. Néanmoins afin d'éviter des interférences avec le coumarate formé qui absorbe faiblement à 340 nm, les mesures seront effectuées à 350 nm, une longueur d'onde où seul le NADPH réduit montre une forte absorption. Plus précisément, on réalise un mélange réactionnel, constitué d'une dilution 200 fois (concentration finale en CA4H est de 6 nM) de la solution stock de microsomes dans un tampon phosphate 50 mM à pH 7,4 et du NADPH réduit en excès à 0,1 mg/ml. Ce mélange est réparti à parties égales dans deux cuvettes spectrophotométriques, on ajoute des concentrations croissantes de tr-cinnamate au temps zéro, puis on suit par spectrophotométrie différentielle la diminution de l'absorption initiale à 350 nm dans le temps dans la cuve d'essai par rapport à la cuve témoin. On a effectué les enregistrements de cette expérience pour des concentrations en tr-cinnamate de 0, 0,4, 0,8, 1,6, 3,2, 6,4, 12,6 et 25 microM. A partir des pentes obtenues, il est donc possible de les convertir directement en activité CA4H et de réaliser une représentation selon Lineweaver-Burk en reportant l'inverse des activités CA4H

mesurées en fonction de l'inverse de la concentration de tr-cinnamate ajoutée au milieu réactionnel. Le point d'intersection de la droite ainsi obtenue (figure 9 avec l'axe Y donnent la valeur de la vitesse maximum de conversion de la CA4H, tandis que le point d'intersection avec l'axe X donne la valeur du Km. La vitesse maximale in vitro de $400 \pm 50 \text{ min}^{-1}$ est la plus grande obtenue à ce jour pour un P450 eucaryotique ce qui montre bien que dans un contexte génétique où il est possible de surexprimer simultanément la P450 Réductase de levure et la CA4H, S. cer. fournit le meilleur environnement connu actuellement afin de faire fonctionner de façon très efficace un cytochrome P450 végétal. Sur la base des activités mesurées in vitro, la souche WRCA est un excellent candidat pour réaliser la bioconversion du tr-cinnamate en coumarate par la CA4H à l'échelle industrielle. Dans ce sens la valeur très basse du Km de 1,2 μM acquiert toute son importance, puisque de faibles concentrations intracellulaires en tr-cinnamate de l'ordre micromolaire suffisent pour faire tourner la CA4H à plein régime.

3.8 Mesure directe de la vitesse maximale de conversion de la CA4H sur des microsomes de WRCA

La mesure de la consommation de NADPH est certainement très appropriée au niveau expérimental, mais ne constitue qu'une preuve indirecte de l'activité enzymatique de la CA4H. Il reste donc très important de valider les résultats ainsi obtenus sous 3.7 par des mesures d'activité réelle, c'est-à-dire les valeurs comparables pour la vitesse maximale de conversion de la CA4H doivent être retrouvées lorsqu'on suit l'activité enzymatique par la mesure de la quantité de tr-coumarate formé. A cette fin l'expérience suivante a été réalisée : un mélange réactionnel de 1 ml contenant 50 mM tampon phosphate pH 7,4, 50 μM tr-cinnamate, 0,1 mg/ml NADPH et 12 pmoles de CA4H (dilution 1 pour 1000 de la solution

stock de microsomes) est préparé sur la glace. Les microsomes sont ajoutés en dernier lieu, puis la réaction est démarré en plaçant le milieu réactionnel complet à 37°C. La réaction est arrêtée aux temps indiqués au tableau 2, par prélèvement d'un échantillon de 50 microlitres auquel on ajoute 2,5 microlitres de l'acide trifluoroacétique, puis on sépare par HPLC dans les conditions décrites ci-dessus. La figure 10 montre la cinétique de la formation du coumarate en se servant des valeurs du tableau 1. En effet dans une initiale de 6 minutes où le substrat est en excès, la formation de tr-coumarate est linéaire dans le temps et décline rapidement ensuite pour atteindre le plateau après 15 minutes seulement. Ceci se traduit par un rapide déclin de la vitesse maximale quand le substrat commence à devenir limitant. Il est très important à noter que la valeur de la vitesse maximale de conversion de la CA4H est de 350 min^{-1} lorsque le substrat est en excès, une valeur qui est en parfaite concordance avec les valeurs trouvées par test indirect, ce qui renforce les commentaires faits sous 3.7.

TABLEAU 2

Incubation (min.)	tr-coumarate (n moles)	Activité spécifique (min^{-1})
0	0	-
3	13	350
6	25	350
10	32	265
15	41	221
15'50	46	n.d
25	44	n.d

4. Procédé de bioconversion mettant en oeuvre une souche de levure surexprimant la P450 Réductase endogène ainsi qu'un cytochrome P450 végétal. Exemplification par la production de tr-coumarate à partir du tr-cinnamate sur cellules entières contenant la CA4H de topinambour.

Une culture de 200 ml dans un erlenmeyer de 1 L de la souche WRCA est incubée à 27°C sous agitation vigoureuse (200 rpm) dans un milieu YPGAL jusqu'à 5 DO (phase stationnaire de saturation). A ce moment on ajoute du cinnamate à une concentration finale de 100 micromM, puis on continue l'incubation. On prélève des échantillons de 100 microlitres au moment de l'ajout du tr-cinnamate et puis 1, 10, 30, et 100 minutes après l'ajout. Puis on procède à l'extraction selon les méthodes décrites sous 3.3, et on analyse les échantillons par chromatographie HPLC (voir 3.3). La longueur d'onde d'analyse est volontairement choisie à 314 nm, une longueur d'onde où l'absorption du tr-coumarate est presque maximale tandis que le tr-cinnamate n'absorbe que très peu. L'amplitude des pics d'absorption n'est par conséquent pas identique pour une même concentration de tr-cinnamate et du tr-coumarate. Le but de cette expérience étant de quantifier l'évolution de la quantité de tr-coumarate trouvée dans le milieu de culture en fonction du temps, une échelle de concentrations connues de tr-coumarate a été utilisée pour la calibration, permettant de traduire l'amplitude du pic de coumarate en concentration ou en nombre de molécules de tr-coumarate formé. La superposition de 4 chromatogrammes a été réalisée sur les 4 échantillons prélevés aux temps indiqués ci-dessus. Il est évident que très vite après l'ajout du tr-cinnamate, on peut déceler des quantités importantes dans le milieu de culture sans apparition de produits secondaires. Vu la valeur de la constante d'affinité de la CA4H pour le tr-cinnamate qui est

de l'ordre micromolaire, il est clair que au moins 95 % du substrat initialement présent dans la culture seront transformés en tr-coumarate avant que la concentration devienne limitante. Le fait de retrouver des quantités importantes de tr-coumarate rapidement dans le milieu de culture laisse supposer que le tr-cinnamate diffuse suffisamment vite dans la cellule pour que la CA4H puisse fonctionner à plein régime, et aussi que le produit formé n'est pas retenu ou métabolisé dans la levure mais excrété dans le milieu. Ceci rend faisable la récupération puis la purification du produit lors d'une bioconversion à l'échelle industrielle, mais explique aussi l'apparente ino-

10 cuité du coumarate pour la cellule. Il est en effet peu probable d'obtenir en grande quantité un produit par bioconversion s'il est accumulé à l'intérieur de la cellule. Sur la base des pics observés en figure 11 la productivité calculée est de 10 micromoles de coumarate formés/minute. litre de culture. En figure 11 est montrée une cinétique qui reporte le nombre de tr-coumarate formée par cellule

20 de levures (calculé à partir des chromatogrammes) en fonction du temps. Il est clair que ce processus de bioconversion est tout-à-fait stable dans le temps. Ceci est un critère essentiel pour l'application de la souche WRCA pour un procédé industriel d'obtention de tr-coumarate

25 par bioconversion. En extrapolant cette frappante stabilité de la CA4H de topinambour dans la levure par rapport à d'autres cytochromes P450 de mammifères la productivité citée ci-dessus sera d'environ 10 grammes de coumarate formé par jour et par litre de culture dans des conditions

30 de laboratoire. Ces valeurs peuvent raisonnablement être améliorées d'un facteur 5 lors d'un procédé de fermentation industriel.

REVENDEICATIONS

1) Souche de levure permettant la co-expression d'une activité mono-oxygénase de cytochrome P450 hétérologue et d'une NADPH-cytochrome P450-réductase endogène ou hétérologue, caractérisée en ce que l'un des gènes de la NADPH-cytochrome P450-réductase ou du cytochrome P450 est intégré dans le chromosome de ladite souche, et, la souche est transformée par un vecteur portant une cassette d'expression de l'autre gène.

2) Souche de levure selon la revendication 1 permettant la co-expression d'une activité mono-oxygénase de cytochrome P450 hétérologue et d'une NADPH-cytochrome P450-réductase endogène ou hétérologue, caractérisée en ce que le gène de la NADPH-cytochrome P450-réductase est intégré dans le génome chromosomique de ladite souche et la souche est transformée par un vecteur portant une cassette d'expression du gène de cytochrome P450 microsomal hétérologue.

3) Souche selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit vecteur est un vecteur d'intégration ou un vecteur répliatif.

4) Souche selon la revendication 3, caractérisée en ce que ledit vecteur est un vecteur répliatif.

5) Souche selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le cytochrome P450 microsomal hétérologue est d'origine végétale.

6) Souche selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que le cytochrome P450 microsomal hétérologue est la protéine CA4H de topinambour Helianthus tuberosus.

7) Souche selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que ledit cytochrome P450 est la protéine CA4H de topinambour Helianthus tuberosus.

8) Souche selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que ledit gène dudit cytochrome P450 est un gène hybride.

9) Souche selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que la NADPH-cytochrome P450-réductase est la NADPH-cytochrome P450-réductase endogène de levure.

10) Souche selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que ledit gène de la NADPH-cytochrome P450-réductase consiste dans la séquence d'ADNc codant pour la NADPH-cytochrome P450-réductase hétérologue.

11) Souche selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que ledit gène de la NADPH-cytochrome P450-réductase est celui d'une NADPH-cytochrome P450-réductase d'origine végétale.

12) Souche selon la revendication 11, caractérisée en ce que la
5 NADPH-cytochrome P450-réductase est une NADPH-cytochrome P450-réductase d'Arabidopsis thaliana.

13) Souche selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que la NADPH-cytochrome P450-réductase est une NADPH-cytochrome P450-réductase de topinambour Helianthus tuberosus.

10 14) Souche selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisée en ce que le gène de la NADPH-cytochrome P450-réductase est intégré dans le locus de la NADPH-cytochrome P450-réductase endogène.

15) Souche de levure selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisée en ce que la levure est choisie parmi les genres
15 Saccharomyces, Hansenula, Kluyveromyces, Pichia, et Yarrowia.

16) Souche selon la revendication 15, caractérisée en ce que la levure est du genre Saccharomyces cerevisiae.

17) Souche l'une des revendications 1 à 16, caractérisée en ce que dans ledit vecteur d'expression le gène de cytochrome P450 est mis sous le
20 contrôle d'un promoteur inductible.

18) Souche selon la revendication 17, caractérisée en ce que ledit vecteur est le vecteur pYEDP60.

19) Souche selon l'une des revendications 1 à 18, caractérisée en ce que le gène de NADPH-cytochrome P450-réductase est placé sous le
25 contrôle d'un promoteur hétérologue inductible.

20) Souche selon l'une des revendications 1 à 19, caractérisée en ce que le gène de NADPH-cytochrome P450-réductase et le gène de cytochrome P450 sont placés sous le contrôle d'un même promoteur inductible.

30 21) Souche selon l'une des revendications 17 à 20, caractérisée en ce que ledit promoteur inductible est le promoteur GAL10/CYC1.

22) Souche selon l'une des revendications 1 à 21, caractérisée en ce que ladite souche est obtenue à partir de la souche PES 1-3-U déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) sous le n° I-
35 1187.

23) Souche selon l'une des revendications 1 à 22, caractérisée en ce que ladite souche est la souche WRCA obtenue par transformation de la souche PES 1-3-U par le vecteur pCA4H/YeDP60.

5 24) Souche de levure selon l'une des revendications 1 à 23, caractérisée en ce qu'elle permet la co-expression de la NADPH-cytochrome P450-réductase et du cytochrome P450 dans un rapport molaire NADPH-cytochrome P450-réductase/cytochrome P450 optimum qui est entre 1/3 et 1/10.

10 25) Procédé de co-expression chez une levure de l'activité mono-oxygénase de cytochrome P450 microsomal hétérologue et de NADPH-cytochrome P450 endogène ou hétérologue, caractérisé en ce qu'on cultive dans un milieu de culture approprié une souche selon l'une des revendications 1 à 24.

15 26) Utilisation à des fins de bioconversion d'une souche de levure selon l'une des revendications 1 à 24.

20 27) Procédé de bioconversion destiné à la monooxydation spécifique d'un composé substrat d'un cytochrome P450, caractérisé en ce qu'on convertit un milieu contenant ledit composé ou un précurseur avec l'une des souches selon l'une des revendications 1 à 24, exprimant l'activité monooxygénase dudit cytochrome P450 et en ce qu'on récupère ledit composé substrat monooxygéné.

28) Procédé selon la revendication 27, caractérisé en ce que ledit milieu est un milieu de culture.

25 29) Procédé de bioconversion selon l'une des revendications 27 ou 28, caractérisé en ce que la monooxygénation est une hydroxylation stéréospécifique.

30 30) Procédé selon la revendication 29, caractérisé en ce que le cytochrome P450 est la CA4H, le composé substrat est le trans-cinnamate, et on récupère le trans-coumarate.

31) Séquence d'ADNc codant pour le cytochrome P450 CA4H de topinambour Helianthus tuberosus.

32) Séquence d'ADNc selon la revendication 30 telle que représentée à la figure 1.

35 33) Séquence d'ADNc s'hybridant dans des conditions faiblement stringentes à 50°C et/ou présentant au moins 60 % d'homologie avec l'une des séquences selon la revendication 31 ou 32.

2 / 12

AAATCACACA ACACCACCAC CACCGTAACC ATG GAC CTC CTC CTC ATA GAA 51
 Met Asp Leu Leu Ile Glu
 1 5

AAA ACC CTC GTC GCC TTA TTC GCG CGC CAT TAT CGG CCA ATA CTA ATC 99
 Lys Thr Leu Val Ala Leu Phe Ala Lys His Tyr Lys Pro Ile Leu Ile
 10 15 20

TCC AAA CTC CGC GGT AAA AAA TTC AAG CTC CCA CCT GGC CCA ATC CCG 147
 Ser Lys Leu Lys Gly Lys Lys Phe Lys Leu Pro Pro Gly Pro Ile Pro
 25 30 35

GTT CCA ATT TTC GGC AAC TGG CTA CAA GTT GGC GAT GAT TTG AAC CAC 195
 Val Pro Ile Phe Gly Asn Trp Leu Gln Val Gly Asp Asp Leu Asn His
 40 45 50 55

CGG AAC TTA ACC GAT CTG GCT AAG AGG TTT GGT GAG ATC TTG CTG CTA 243
 Lys Asn Leu Thr Asp Leu Ala Lys Lys Phe Gly Glu Ile Leu Leu Leu
 60 65 70

CGC ATG GGG CAG AGG AAT CTG GTA GTT GTG TCT TCG CCT GAG CTT GCT 291
 Lys Met Gly Gln Lys Asn Leu Val Val Ser Ser Pro Glu Leu Ala
 75 80 85

AAA GAG GTG TTG CAT ACA CAA GGA GTG GAG TTT GGT TCG AGA ACA AGG 339
 Lys Glu Val Leu His Thr Gln Gly Val Glu Phe Gly Ser Lys Thr Lys
 90 95 100

FIG. 1B.

SEQ ID NO : 1

TYPE DE SEQUENCE : Nucléotides et les acides aminés correspondants

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 1608 paires de base

NOMBRE DE BRINS : séquence double brin représentée par un seul brin dans le sens 5' - 3' et de gauche à droite

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADN complémentaire

ORIGINE

ORGANISME : *Helianthus tuberosus* L. variété blanc commun

SOURCE EXPERIMENTALE IMMEDIATE :

tubercules d'*hélianthus tuberosus* L. variété blanc commun

CARACTERISTIQUES :

nucléotides 1 - 30 : bordure 5' non-codante

nucléotides 31 - 1545 : région codante sur le brin présenté

nucléotides 1546 - 1608 bordure 3' non-codante

PROPRIETES :

ADNc codant pour un cytochrome P450 végétal, Cinnamate 4-Hydroxylase (CA4H) Cet enzyme porte le numéro E. C. 1. 14. 13. 1

3/12

AAT GTT GTG TTC GAT ATT TTT ACT GGG AAG GGT CAG GAT ATG GTG TTT	387
Asn Val Val Phe Asp Ile Phe Thr Gly Lys Gly Gln Asp Met Val Phe	
105 110 115	
ACG GTT TAT GGT GAG CAT TGG AGG AAG ATG AGG ATC ATG ACC GTA	435
Thr Val Tyr Gly Glu His Trp Lys Lys Met Lys Lys Ile Met Thr Val	
120 125 130 135	
CCC TTT TTC ACC AAC AAA GTT GTT CAG CAA TAC AGG TAT GGG TGG GAG	483
Pro Phe Phe Thr Asn Lys Val Val Gln Gln Tyr Lys Tyr Gly Trp Glu	
140 145 150	
GCT GAG GCC GCG GCG GTT GTG GAC GAT GTG AAG AAG AAT CCG GCT GCA	531
Ala Glu Ala Ala Ala Val Val Val Asp Asp Val Lys Lys Asn Pro Ala Ala	
155 160 165	
GCA ACT GAA GGA ATC GTG ATC CGA AGA CGG TTA CAA CTC ATG ATG TAT	579
Ala Thr Glu Gly Ile Val Ile Lys Lys Lys Leu Gln Leu Met Met Tyr	
170 175 180	
AAC AAC ATG TTC AGA ATC ATG TTC GAC AGA CGA TTC GAA AGT GAA GAT	627
Asn Asn Met Phe Lys Ile Met Phe Asp Lys Lys Phe Glu Ser Glu Asp	
185 190 195	

FIG. 1B.

4 / 12

GAT CCC TTG TTT TTG AAA CTC AAG GCG TTG AAC GGT GAG AGG AGT CGA	675
Asp Pro Leu Phe Leu Lys Leu Lys Ala Leu Asn Gly Glu Lys Ser Lys	215
200	
205	
TTG GCG CAG AGC TTT GAG TAC AAC TAT GGC GAT TTC ATC CCT ATT TTG	723
Leu Ala Gln Ser Phe Glu Tyr Asn Tyr Gly Asp Phe Ile Pro Ile Leu	230
220	
225	
CGG CCG TTT TTG AGA AAT TAT TTG AAG TTG TGC AAG GAA GTT AAA GAT	771
Lys Pro Phe Leu Lys Asn Tyr Leu Lys Leu Cys Lys Glu Val Lys Asp	245
235	
240	
AAA AGG ATT CAG CTC TTC AAG GAT TAC TTC GTT GAC GAA AGG, AAG AAG	819
Lys Lys Ile Gln Leu Phe Lys Asp Tyr Phe Val Asp Glu Lys Lys Lys	260
250	
255	
260	
ATT GGA AGC ACT AAG AAA ATG GAC AAC AAT CAG TTG AAA TGT GCC ATT	867
Ile Gly Ser Thr Lys Lys Met Asp Asn Asn Gln Leu Lys Cys Ala Ile	275
265	
270	
GAT CAC ATT CTT GAA GCT AAA GAG AAG GGT GAG ATC AAT GAA GAC AAT	915
Asp His Ile Leu Glu Ala Lys Glu Lys Gly Glu Ile Asn Glu Asp Asn	295
280	
285	
290	
GTT CTT TAC ATT GTT GAA AAC ATC AAT GTT GCA GCA ATC GAG ACA ACT	963
Val Leu Tyr Ile Val Glu Asn Ile Asn Val Ala Ala Ile Glu Thr Thr	310
300	
305	

FIG. 1C.

5/12

1011
 CTA TGG TCG ATC GAA TGG GGA ATT GCG GAG CTA GTT AAC CAT CCC GAG
 Leu Trp Ser Ile Glu Trp Gly Ile Ala Glu Leu Val Asn His Pro Glu
 315 320 325

 1059
 ATC CAA GCC AAA CTC AGG CAC GAG CTC GAC ACC AAG CTC GGG CCC GGT
 Ile Gln Ala Lys Leu Lys His Glu Leu Asp Thr Lys Leu Gly Pro Gly
 330 335 340

 1107
 GTC CAG ATC ACC GAG CCG GAC GTC CAA AAC CTC CCT TAC CTC CAA GCC
 Val Gln Ile Thr Glu Pro Asp Val Gln Asn Leu Pro Tyr Leu Gln Ala
 345 350 355

 1155
 GTG GTC AAG GAA ACC CTC CGT CTC CGT ATG GCG ATC CCG CTT CTA GTC
 Val Val Lys Glu Thr Leu Lys Leu Lys Met Ala Ile Pro Leu Leu Val
 360 365 370 375

 1203
 CCA CAC ATG AAC CTC CAT GAC GCT AAG CTC GGC GGG TTT GAC ATC CCG
 Pro His Met Asn Leu Leu His Asp Ala Lys Leu Gly Phe Asp Ile Pro
 380 385 390

 1251
 GCC GAA AGC AAG ATC TTG GTC AAC GCG TGG TGG TTA GCA AAC AAC CCC
 Ala Glu Ser Lys Ile Leu Val Asn Ala Trp Trp Leu Ala Asn Asn Pro
 395 400 405

FIG. 1C.

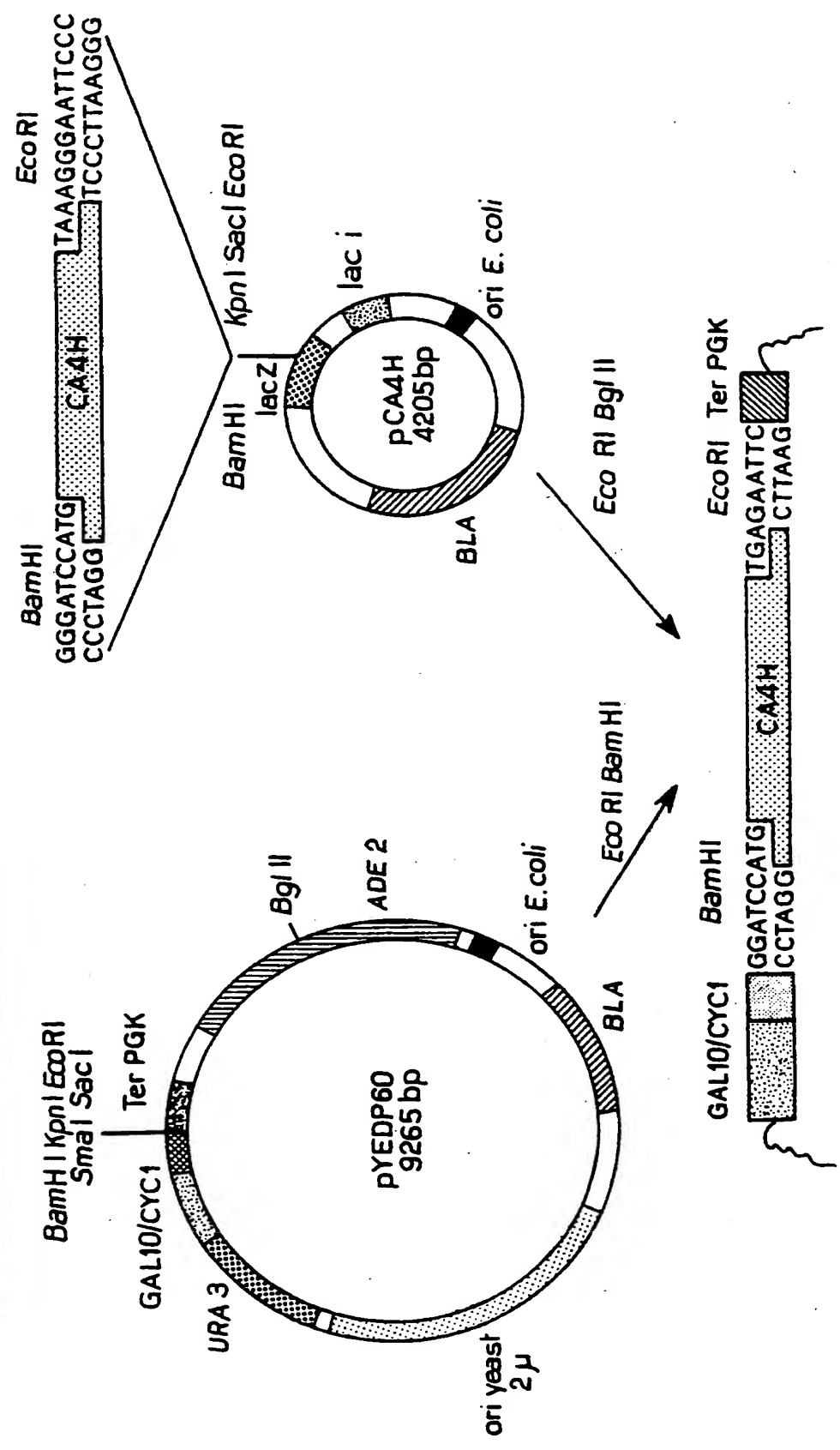
6/12

GAC CAA TGG AAG AAA CCC GAG GAG TTT AGG CCA GAG AGG TTT TTG GAA	1299
Asp Gln Trp Lys Lys Pro Glu Glu Phe Lys Pro Glu Lys Phe Leu Glu	
410 415 420	
GAG GAA GCG AAG GTT GAG GCT AAC GGG AAT GAT TTT AGG TAC TTG CCG	1347
Glu Glu Ala Lys Val Glu Ala Asn Gly Asn Asp Phe Lys Tyr Leu Pro	
425 430 435	
TTT GGA GTC GGG AGA AGG AGT TGC CCC GGG ATT ATT CTT GCA TTG CCG	1395
Phe Gly Val Gly Lys Lys Ser Cys Pro Gly Ile Ile Leu Ala Leu Pro	
440 445 450 455	
ATA CTT GGT ATT ACA ATC GGG CGT TTG GTG CAG AAT TTC GAG CTG TTG	1443
Ile Leu Gly Ile Thr Ile Gly Lys Leu Val Gln Asn Phe Glu Leu Leu	
460 465 470	
CCT CCA CCG GGA CAG TCT AAG ATC GAT ACC GAT GAG AAG GGT GGG CAG	1491
Pro Pro Pro Gly Gln Ser Lys Ile Asp Thr Asp Glu Lys Gly Gly Gln	
475 480 485	
TTT AGT TTG CAT ATC TTG AAG CAC TCT ACT ATC GTA GCT AAA CCT AGG	1539
Phe Ser Leu His Ile Leu Lys His Ser Thr Ile Val Ala Lys Pro Lys	
490 495 500	
TCA TTT TAA GG ATTCCTTGTTT ATGTTCTTTTA TTGTATGATA AACCAAGGGG	1590
Ser Phe	
505	
GGGGGGAAAA AAAAAAA	1608

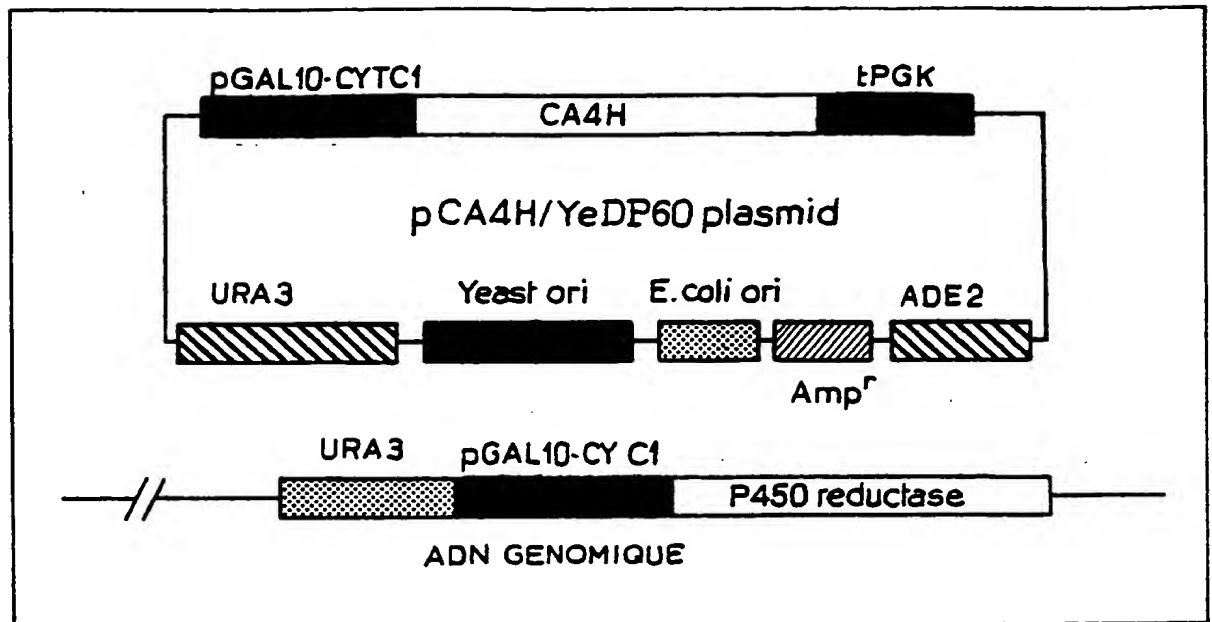
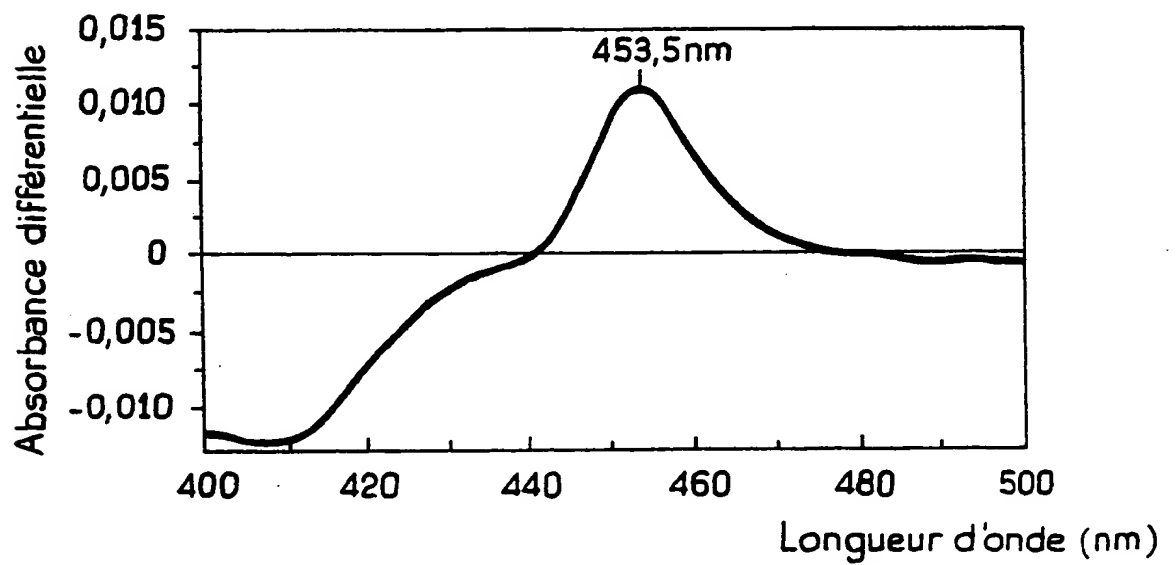
FIG. 1D

FIG. 2

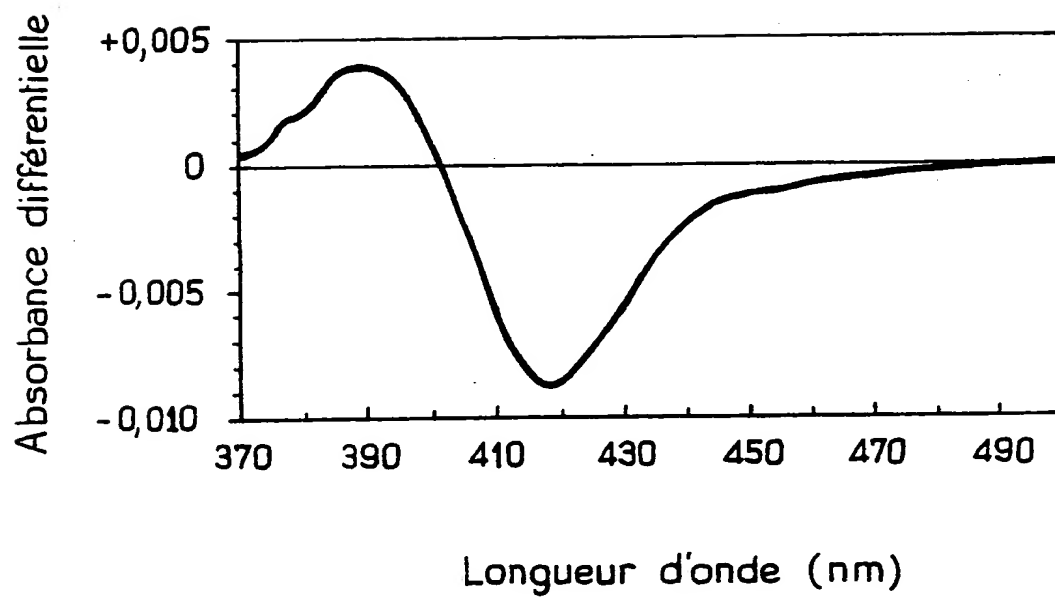
CLONAGE DE LA CA4H DE TOPINAMBOUR DANS LE VECTEUR DE LEVURE pYEDP60

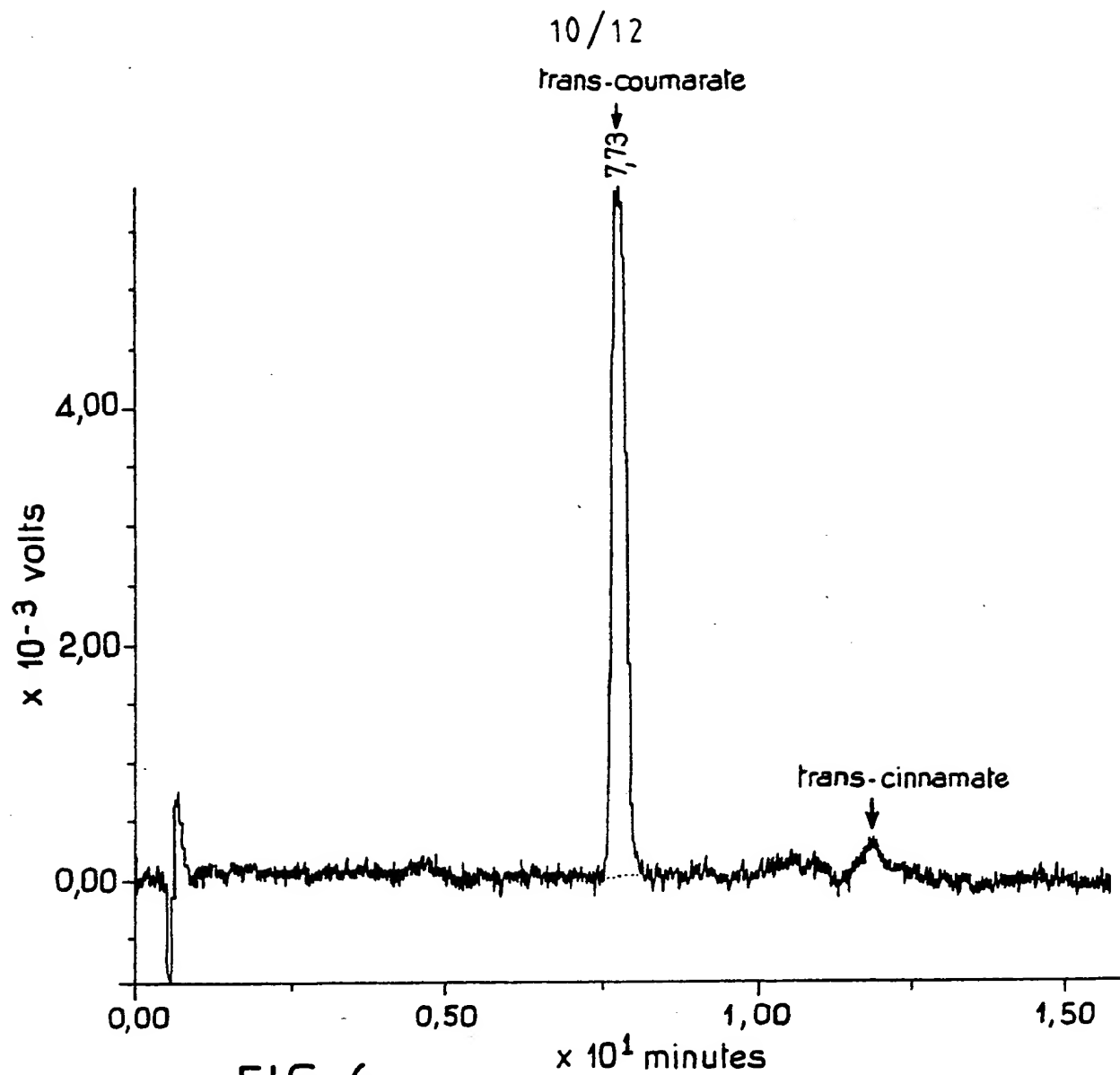
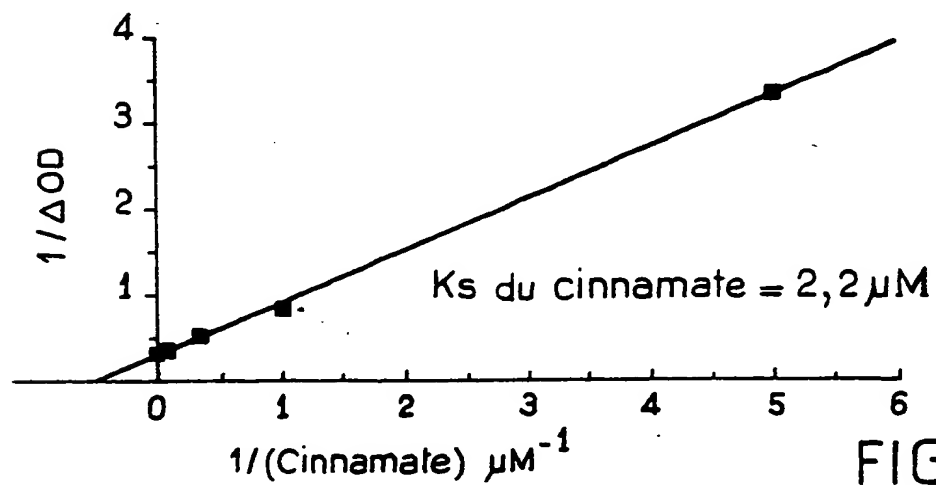


8 / 12

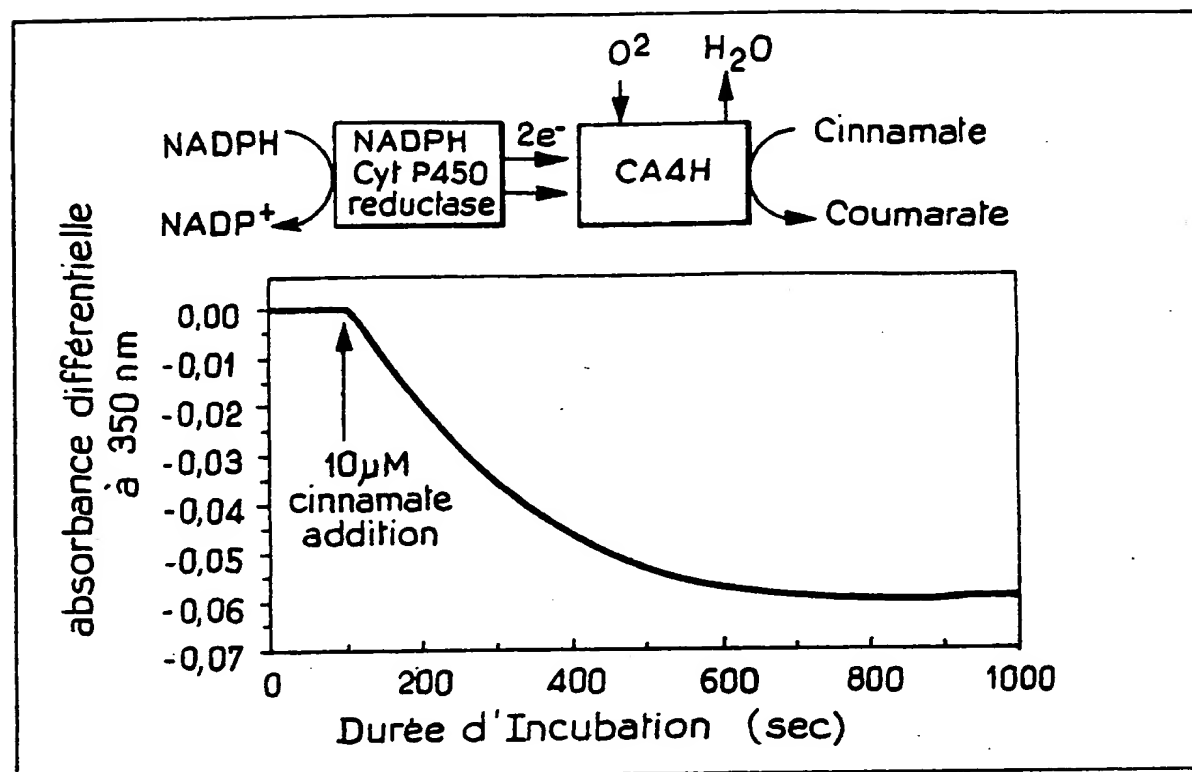
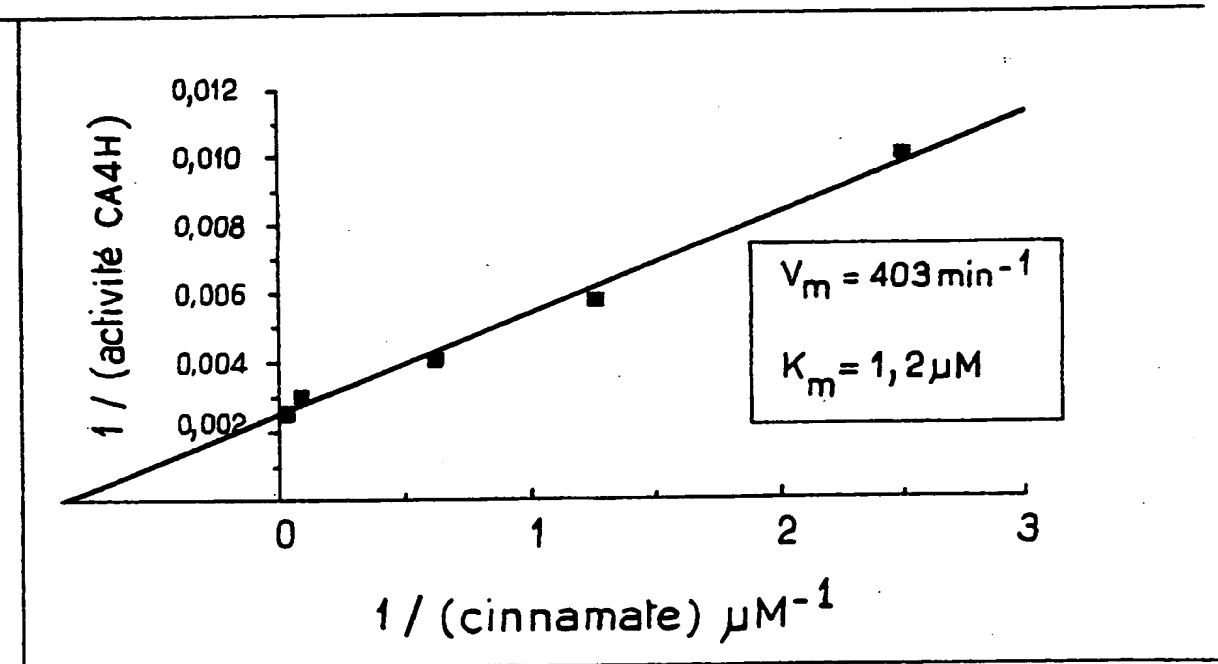
FIG. 3FIG. 4

9/12

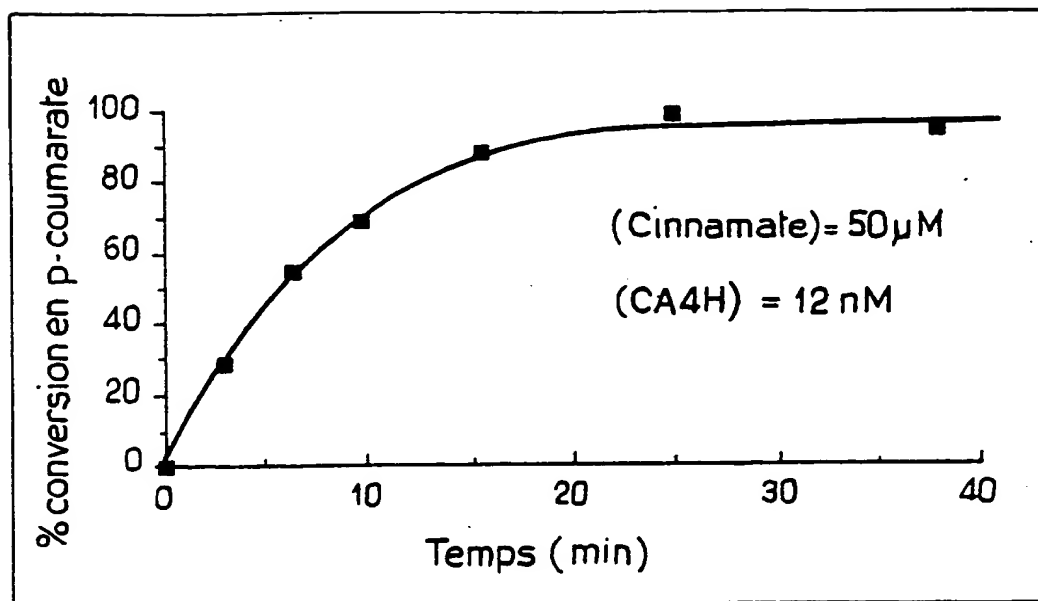
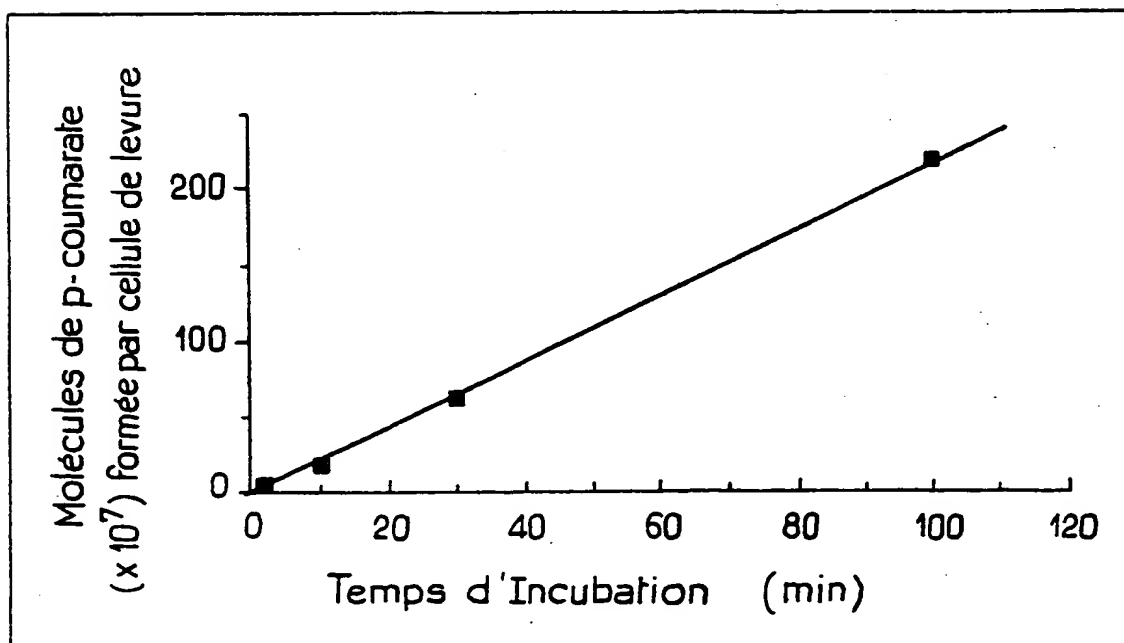
FIG.5

FIG. 6FIG. 7

11 / 12

FIG.8FIG.9

12 / 12

FIG.10FIG.11

**INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE**

RAPPORT DE RECHERCHE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FR 9208254
FA 474299
PAGE1

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO-A-9 114 781 (HENKEL RESEARCH CORP.)	1-4, 9, 14, 15, 25-29, 24
A	* page 2, ligne 20 - ligne 25; revendication A *	
	* page 5, ligne 33 - ligne 34 *	

Y	DNA vol. 5, no. 1, 1986, NEW YORK US pages 1 - 10 MURAKAMI H; YABUSAKI Y; OHKAWA H 'EXPRESSION OF RAT NADPH- CYTOCHROME P 450 REDUCTASE COMPLEMENTARY DNA IN SACCHAROMYCES CEREVISIAE.'	1, 25
	* le document en entier *	

Y	DATABASE WPIL Week 8949, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 89-357919 [49] & EP-A-344 459 (PHILLIPS PETROLEUM CO) 1989 * abrégé *	1, 25

A	JOURNAL OF BIOCHEMISTRY. vol. 108, no. 5, 1990, TOKYO JP pages 859 - 865 Murakami, Hiroko; Yabusaki, Yoshiyasu; Sakaki, Toshiyuki; Shibata, Megumi; Ohkawa, Hideo 'Expression of cloned yeast NADPH- cytochrome P450 reductase gene in Saccharomyces cerevisiae' * le document en entier *	1, 2, 9, 10, 15-17, 19

	---/---	
Date d'achèvement de la recherche 17 DECEMBRE 1992		Examinateur GURDJIAN D.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite D : document intermédiaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>.....</p> <p>& : membre de la même famille, document correspondant</p>		

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS vol. 86 Philadelphia, PA, US; abstract no. 262670, BENVENISTE I; GABRIAC B; DURST F 'PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE NADPH- CYTOCHROME P- 450 CYTOCHROME C REDUCTASE FROM HIGHER- PLANT MICROSOMAL FRACTION.' * abrégé * & BIOCHEM J 235 (2). 1986. 365-374. ---	6,7,13
A	DATABASE WPIL Week 9040, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 90-301024 [40] & JP-A-2 211 880 (AGENCY OF IND SCI TECH) 23 Août 1990 * abrégé * -----	8
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
Date d'achèvement de la recherche 17 DECEMBRE 1992		Examinateur GURDJIAN D.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'un moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

REPUBLIQUE FRANÇAISE

10 JUIL. 1998 - A C

INSTITUT NATIONAL

de la
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREtabli sur la base des dernières revendications
déposées avant l' commencement de la rechercheN° d'enregistrement
nationalFA 549915
FR 9712094

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	EP 0 255 233 A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 3 février 1988 * page 3, ligne 3 - page 8, ligne 12 *	1, 18, 22-28
Y	---	2-17
X	GB 2 216 530 A (MINI AGRICULTURE & FISHERIES) 11 octobre 1989 * page 5, ligne 1 - ligne 26 * * page 30; tableau 1 *	1
X	US 5 096 825 A (BARR PHILIP J ET AL) 17 mars 1992 * colonne 3, ligne 62 - colonne 6, ligne 39 *	1
Y	FR 2 693 207 A (ORSAN) 7 janvier 1994 * page 3, ligne 17 - page 6, ligne 15 * * page 11, ligne 1 - page 13, ligne 27 *	2-17
A	MURRAY E E ET AL: "CODON USAGE IN PLANT GENES" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 17, no. 2, 25 janvier 1989, OXFORD GB, pages 477-498, XP000008653 * le document en entier *	1-11
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C12N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
30 juin 1998		Se Kok, A
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui a été publié qu'à cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

THIS PAGE BLANK (USPTO)